

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **60-043386**(43)Date of publication of application : **07.03.1985**

(51)Int.Cl.

**C12P 1/00**  
**C12N 5/00**  
**// (C12P 1/00**  
**C12R 1:91 )**(21)Application number : **58-150949**(71)Applicant : **KOKEN KK**  
**TAJIMA TOMOYUKI**  
**NAGANUSHI YOUICHIROU**(22)Date of filing : **20.08.1983**(72)Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI****(54) PREPARATION OF AGENT FOR SUPPRESSING MULTIPLICATION OF MALIGNANT TUMOR CELL OF ANIMAL**

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an agent for suppressing multiplication of malignant tumor cell of animal, by carrying out subculture of malignant tumor cell, cultivating the cell in an extraction medium containing glucose, extracting it from the medium.

CONSTITUTION: A malignant tumor cell, for example, established cell derived from human renal cell cancer HRC, is subjected to subculture by the use of a growth medium containing 10wt% newborn calf serum. The cell is then cultivated in an extraction medium containing 2W5g/l glucose free from serum at 30W37°C for about one week. After the cultivation is over, the malignant tumor cell is eliminated from the medium. A strong agent for suppressing multiplication of malignant tumor cell is obtained by extracting it from the medium.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 特許公報(B2)

平3-61650

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 35/12識別記号  
ADU庁内整理番号  
8615-4C

⑭ 公告 平成3年(1991)9月20日

発明の数 1 (全2頁)

⑮ 発明の名称 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の製造方法

⑯ 特 願 昭58-150949

⑰ 公 開 昭60-43386

⑱ 出 願 昭58(1983)8月20日

⑲ 昭60(1985)3月7日

⑳ 発 明 者 田 島 知 行 千葉県市川市八幡 6-5-15  
 ㉑ 出 願 人 興 研 株 式 会 社 東京都千代田区四番町 7 番地  
 ㉒ 出 願 人 田 島 知 行 千葉県市川市八幡 6-5-15  
 ㉓ 出 願 人 長 主 陽 一 朗 神奈川県大和市中央 3 丁目 9 番 4 号  
 ㉔ 代 理 人 弁 理 士 竹 本 松 司 外 1 名  
 ㉕ 審 査 官 内 藤 伸 一  
 ㉖ 参 考 文 献 特 開 昭 58-138383 (JP, A) 特 開 昭 59-33223 (JP, A)

1

2

## ㉗ 特許請求の範囲

- 1 (a) 牛血清を添加したベイスルメディウムイーグル (Basel Medium Eagle) を培地として飽和状態になるまで培養するか、  
 (b) 牛血清とグルコースとを添加したベイスルメディウムイーグルを培地として継代培養し、血清を除いて無血清の抽出培地に移し、培地 1 ℓ に対して 2 g ~ 5 g の濃度にグルコースを添加し、30℃~37℃で 1 週間培養し、培養した培地からヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を除去して培地を採取することを特徴とするヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の製造方法。

## 発明の詳細な説明

この発明は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の製造方法に関する。

本出願人は、すでに動物の悪性腫瘍細胞の培養後培地より悪性腫瘍細胞を除いて抽出したものからなる動物の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤を特願昭57-143340号(特開昭59-33223号)として提案した。この悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、正常細胞に対して致死効果がなく、悪性腫瘍細胞に対して増殖抑制や致死効果を特異に有している。

この発明の目的は、先に提案したものより、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対し、さらに著しい増殖抑制効果を有する増殖抑制剤を製造すること

にある。

この発明のヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制剤の製造方法は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を、

- 5 (a) 牛血清を添加したベイスルメディウムイーグル (Basel Medium Eagle) を培地として飽和状態になるまで培養するか、  
 (b) 牛血清とグルコースとを添加したベイスルメディウムイーグルを培地として継代培養し、血清を除いて無血清の抽出培地に移し、培地 1 ℓ に対して 2 g ~ 5 g の濃度にグルコースを添加し、30℃~37℃で 1 週間培養し、培養した培地からヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を除去して培地を採取することを特徴とするものである。  
 15 この発明によれば、先に提案した悪性腫瘍細胞の増殖抑制剤と比べ、数倍の力価を有するヒト腎細胞癌由来樹立株細胞の増殖抑制を得ることができ、少ない投与量でヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対し、著しい増殖抑制効果を得ることができ

20 る。

次に、この発明の実施例について述べる。

## (実施例 1)

## 1 使用した細胞

ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC

## 2 培養方法

まず、10%新生仔牛血清を添加したBasel Medium Eagle(BME)を成長用培地として用い、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを加え、培養器に飽和状態になるまで、この悪性腫瘍細胞を増殖させる。その後、1回洗って血清を除き、これを抽出培地に移し、無血清培地に1ℓ中2g及び5gの濃度でグルコースを添加し、30°~37℃の温度条件の下で一週間培養を行なう。抽出培地にグルコースを添加する方法の効果を確認するために、対照群として10%新生仔牛血清添加のBMEにアミノ酸ビタミンを添加した培地で同様に培養した。

### 3 採取方法

培養した培地からヒト腎細胞癌由来樹立株成分を除去し、培地を採取する。

次に、実施例1の効果を確認するための実験について述べる。

### 1 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞増殖抑制剤の検定方法

15mm径のプラスチックシャーレに入れた10%新生仔牛血清を添加したBMEの培地にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを10<sup>4</sup>個植え込み、24時間培養した後、前記実施例1の方法で製造された物質を含む培地等の実験用培地と交換し、1日おきに同培地で培地交換を行ない、細胞の増殖状態を6日目に測定する。また、対照群の培地にも、検定に用いる培地を同様の条件にするために、1ℓ中1gのグルコースを添加する。

### 2 実験結果

( 表 1 )

実験群	グルコース濃度 g/ℓ	細胞数 (×10 <sup>4</sup> cells/ plate)	生存率 (%)
対照	1	23	100
lot 112	112-1	1	48
	112-3	1	50
	112-4	2	17
	112-5	5	12

生存率は、対照群の細胞数を100とし、この発

明により得られた物質を含む培地の細胞数を百分率で算出して比較したものである。このことから抽出培地が高グルコースのものに、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞に対する増殖抑制の力価の上昇が認められた。したがって、抽出培地に1ℓ中4~5gのグルコースを添加すれば、先に提案したものより数倍の増殖抑制効果があり、少ない投与量で著しい効果を得ることができる。

### (実施例 2)

#### 1 使用した細胞

ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRC

#### 2 培養方法

まず、10%新生仔牛血清を添加したBasel Medium Eagle(BME)にグルコースを1ℓ中5g添加し、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞HRCを継代培養する。次に、実施例1と同様に、1回洗って血清を除き、これを抽出培地に移し、グルコースを添加し、培養する。

#### 3 採取方法

実施例1と同様である。

また、検定法及び実験結果の考察についても実施例1と同様であり、以下に実験結果を表2に示す。

( 表 2 )

実験群	グルコース濃度 g/ℓ	細胞数 (×10 <sup>4</sup> cells/ plate)	生存率 (%)
対照	1	31	100
lot 113	113-3	1	32
	113-4	2	16
	113-5	5	14